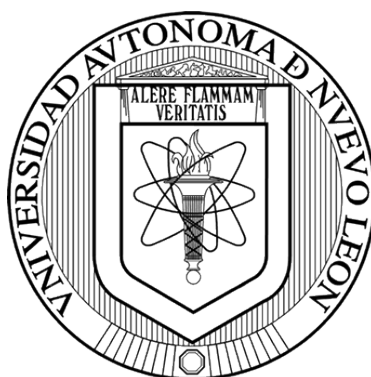


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DEL COMPLEJO *CANDIDA GLABRATA***

POR

QBP JOSÉ FERNANDO ESPINOSA PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

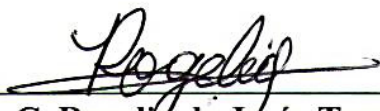
AGOSTO, 2017

**"Evaluación de factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica de
aislamientos clínicos del complejo *Candida glabrata*"**

Aprobación de la Tesis:



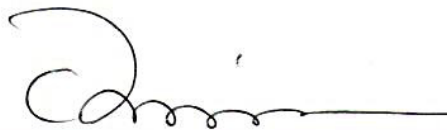
Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel
Codirector de Tesis



Dr. C. Mariana Elizondo Zertuche
Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“Evaluación de factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica de
aislamientos clínicos del complejo *Candida glabrata*”**

Presentado por: QBP José Fernando Espinosa Pérez

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), con el número de registro: MB15-001. La ejecución experimental tuvo lugar en el Laboratorio de Micología y el Laboratorio de Biología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas anexo al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL. El trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dr. C. Gloria María González González y la codirección del Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel.



Dr. C. Gloria María González González

DEDICATORIA

A mis padres por darme la mejor de las herencias y haberme acompañado durante todos mis años de formación.

A mi hermana por haberme compartido y contagiado sus gustos para formar quien soy ahora y hacernos más cercanos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme prestado vida y llenarme de bendiciones para llegar hasta donde estoy ahora y cumplir todas las metas que me he propuesto.

A mi familia por tener siempre su apoyo para decidir en mi carrera profesional.

A mi novia Mayra que siempre me ha apoyado en mis decisiones y me ha inspirado a seguir mis sueños.

A mis compañeros: Alexandra, Caro, Christian, Cynthia, Gerardo, Gladys, Itzel «ñoña», Karen, Marcos, Orlando, Rebeca, Valeria y Vanessa, quienes hicieron muy gratos estos dos años de estancia, compartieron conmigo su conocimiento y hasta sus costumbres.

A los trabajadores del CRCEI y el tercer piso con quienes conviví y también me compartieron de su conocimiento: Alma, Liz, Byron, Miguel, Cecy, July, Anahí, Agustina, Luis, «Frankie», «Hemingway» y Álvaro.

A todos aquellos amigos que conservo desde hace tiempo, se alegraron de mis éxitos y se esfuerzan porque la amistad siga viva.

A mi comisión de tesis por siempre brindarme su apoyo y sus consejos, además de mostrar su lado informal con nosotros. ¡Muchas gracias!

Al CONACyT por darme el soporte económico durante mi formación en el posgrado.

A TODOS ¡MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Infecciones fúngicas	3
2.2 Micosis oportunistas	4
2.3 Candidosis	5
2.4 Factores de riesgo para candidemia	9
2.5 Mortalidad, tiempo de estancia hospitalaria y costo hospitalario por candidemia	11
2.6 Diagnóstico de candidosis	14
2.7 Cambio epidemiológico hacia especies NCA	16
2.8 Complejo <i>Candida glabrata</i>	18
2.9 Susceptibilidad antifúngica en <i>Candida glabrata</i>	24
2.10 Factores de virulencia en <i>Candida glabrata</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1 Estrategia general	33
4.2 Organismos	34
4.3 Identificación molecular	34
4.3.1 Obtención del ADN	34
4.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
4.3.3 Secuenciación	36
4.4 Perfil enzimático	37
4.4.1 Ensayo de fosfolipasas	37
4.4.2 Ensayo de proteasas	38
4.4.3 Ensayo de hemolisinas	38
4.4.4 Ensayo de esterasas	39
4.4.5 Ensayo de DNasas	39
4.4.6 Ensayo de actividad coagulasa	39
4.4.7 Ensayo de actividad catalasa	40
4.5 Susceptibilidad antifúngica	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Identificación molecular	41
5.2 Perfil enzimático	42
5.3 Susceptibilidad antifúngica	43
6. DISCUSIÓN	45

7. CONCLUSIÓN	48
Capítulo	Página
8. PERSPECTIVAS	49
9. REFERENCIAS	50
10. APÉNDICES	60
Apéndice A: Preparación de reactivos	60
Apéndice B: Divulgación de resultados	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Métodos tradicionales de diagnóstico para la candidosis.	14
2. Nuevas tecnologías diagnósticas para la candidosis.	15
3. Resultados del perfil enzimático de las cepas de <i>C. glabrata sensu stricto</i> .	43
4. Resultados del perfil enzimático de <i>C. bracarensis</i> y <i>C. nivariensis</i> CBS	43
5. Susceptibilidad antifúngica de las cepas de <i>C. glabrata sensu stricto</i> .	44
6. Susceptibilidad antifúngica de <i>C. bracarensis</i> .	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estrategia general del trabajo.	33
2. Imagen representativa de un gel de agarosa al 2 %.	41

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico
ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
BG	1,3-β-D-glucano
BSA	Albúmina sérica bovina
BSI	Del inglés <i>Bloodstream infection</i>
°C	Grado Celsius
CDC	Del inglés <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	Del inglés <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Co.	Del inglés <i>Company</i>
\$	Cantidad monetaria en dólares
Etc.	Etcétera
EUA	Estados Unidos de América
g	Gramos
h	Horas
CI	Candidosis invasiva
UCI	Unidad de cuidados intensivos
Inc.	Del inglés <i>Incorporated</i>
ISHAM	Del inglés <i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ITS	Del inglés <i>internal transcribed spacer</i>
kg	Kilogramo
L	Litro
>	Mayor que
≥	Mayor o igual que
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MDR	Multidrogorresistente
min	Minuto
NCA	No <i>Candida albicans</i>
NCBI	Del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHDS	Del inglés <i>National Hospital Discharge Survey</i>
NNIS	Del inglés <i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
%	Por ciento
%T	Porcentaje de transmitancia

PATH	Del inglés “ <i>Prospective Antifungal Therapy</i> ” <i>Alliance</i>
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDA	Agar dextrosa de Sabouraud
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades formadoras de colonia
vs.	Del latín <i>versus</i>
YM	Agar Levadura Malta
YPD	Extracto de Levadura Peptona Dextrosa

RESUMEN

QBP José Fernando Espinosa Pérez
2017

Fecha de egreso: agosto de

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: "Evaluación de factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica de aislamientos clínicos del complejo *Candida glabrata*"

Número de páginas: 81

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica

Área de estudio: Micología médica

Propósito y Método de estudio: A partir de la reciente descripción de *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis*, especies ubicadas taxonómicamente dentro del complejo *Candida glabrata*, numerosas investigaciones se han enfocado en descifrar su epidemiología global, evaluar sus factores de virulencia y conocer su patrón de susceptibilidad antifúngica. Debido a que estos organismos representan menos del 3 % de los aislamientos totales de *C. glabrata*, se requieren más estudios a nivel mundial para conocer sus tendencias en sus potenciales factores de virulencia y resistencia antifúngica. La presente investigación colaborará con el conocimiento actual sobre la epidemiología en aislamientos clínicos en México, perfiles de actividad enzimática que pudieran conferirle a estas especies mayor virulencia y evaluar sus perfiles de susceptibilidad antifúngica frente a las equinocandinas.

Contribuciones y Conclusiones: Se identificó una cepa de *C. bracarensis*, especie que no reportada previamente en México. La mayoría de las cepas de *C. glabrata sensu stricto* presentaron una producción de aspartil proteasa y fosfolipasa clasificada como "Muy fuerte". El patrón de actividad enzimática de *C. bracarensis* es similar al de *C. glabrata sensu stricto*. Por otra parte, las cepas de *C. glabrata sensu stricto* presentaron bajos porcentajes de resistencia frente a las equinocandinas y no se encontró resistencia de *C. bracarensis* frente a estos antifúngicos. Esta investigación contribuye al conocimiento de la epidemiología local, factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica del complejo *C. glabrata*.



Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El género *Candida* incluye cerca de 200 especies de las cuales 58 son oportunistas en animales y humanos, y de éstas, entre seis y ocho especies son las que más se presentan en infecciones humanas. Por lo regular el género *Candida* tiene las siguientes características: son levaduras no pigmentadas, de forma celular variable (elípticas, globosas, cilíndricas o triangulares), tiene pared celular en dos capas, se reproducen por gemación holoblástica o blastoconidios y la mayoría puede formar pseudohifas e hifas verdaderas (con excepción de *C. glabrata*).

Las infecciones fúngicas invasivas causadas por *Candida* spp. son la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados a nivel mundial, con una tasa cruda de mortalidad cercana al 60 %, además de una prolongada estancia hospitalaria. Aunque *Candida albicans* ha permanecido como el agente predominante de infecciones nosocomiales en las últimas tres décadas, recientemente se describió un importante cambio epidemiológico hacia especies de *Candida* no-*albicans* (NCA) en este tipo de infecciones en varios países de América, Asia y Europa. En este sentido, patógenos emergentes como *C. parapsilosis* y *C. glabrata* cobran cada vez mayor importancia en el escenario clínico. Particularmente, *C. glabrata* se caracteriza por presentar reducida susceptibilidad a fluconazol, así como a otros agentes antifúngicos convencionalmente utilizados para el manejo terapéutico de la infección diseminada. Además, con base en hallazgos moleculares se reportó que *C. glabrata* representa un complejo de tres especies fenotípicamente indistinguibles: *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*, las dos últimas altamente asociadas a multidrogorresistencia (MDR, resistente a dos o más clases

antifúngicos). A la fecha, no se cuenta con reportes de estudios *in vitro* y/o *in vivo* que establezcan la existencia de diferencias importantes en la patogénesis de la infección debida a estos tres patógenos.

A nivel mundial *C. glabrata* ocupa el segundo o tercer lugar como agente etiológico de candidemias, asociada a una elevada tasa de mortalidad en individuos inmunocomprometidos y prevaleciendo en población adulta y de la tercera edad. En México, particularmente en Monterrey, Nuevo León, se sabe que *C. glabrata* ocupa el cuarto lugar como agente causal de candidemia, y que cuya tasa de incidencia incrementa conforme a la edad de los pacientes (≥ 45 años). Sin embargo, pese a su frecuencia de aislamiento, heterogeneidad genética y marcada resistencia antifúngica, en la actualidad se desconoce la distribución de las especies del complejo o clado *C. glabrata* en nuestro país, así como sus perfiles de susceptibilidad frente a los antifúngicos de primera línea y su capacidad de producción de biopelículas y enzimas líticas extracelulares, las cuales se relacionan directamente con la virulencia propia de las especies de este complejo.

Trabajos relacionados publicados recientemente por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto diferencias importantes en cuanto a susceptibilidad antifúngica y perfiles enzimáticos entre *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, especies comprendidas dentro del complejo *C. parapsilosis*; por lo que, con un enfoque similar, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de llevar a cabo la determinación de perfiles enzimáticos asociados a virulencia en una colección de aislamientos de diversos orígenes clínicos del complejo *C. glabrata*.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Infecciones fúngicas

La incidencia de infecciones fúngicas ha incrementado en las últimas décadas, debido, en parte, a importantes avances médicos. El incremento de la esperanza de vida, la mayor supervivencia de los recién nacidos prematuros y de pacientes con cáncer o enfermedades crónicas, el uso de catéteres y terapias inmunosupresoras, son todos factores que han contribuido al alza en infecciones fúngicas. Además, el frecuente uso de antibióticos de amplio espectro elimina competidores bacterianos de la microbiota comensal, predisponiendo al hospedero a infecciones fúngicas (1,2).

Las infecciones fúngicas invasivas son un problema médico serio particularmente entre los pacientes inmunocomprometidos. El manejo de las infecciones fúngicas invasivas se ha visto obstaculizado por la incapacidad para diagnosticar la infección en una etapa temprana de la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de estas infecciones fúngicas sigue siendo difícil, desde que el único signo clínico de la infección es una fiebre prolongada (2). En años recientes, importantes esfuerzos han sido encaminados a desarrollar e implementar métodos basados en la biología molecular para el establecimiento de un diagnóstico oportuno, el cual es crucial para el tratamiento y recuperación de los pacientes con candidemia (2).

Las micosis se pueden dividir en dos grandes categorías: oportunistas y endémicas. Los agentes más importantes de las micosis oportunistas son *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*, y *Aspergillus* spp.; mientras que los más

frecuentemente encontrados en las micosis endémicas son *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis/posadasii* y *Blastomyces dermatitidis* (3).

De todo el espectro de infecciones fúngicas, aquellas más peligrosas, por ser las que presentan una mayor mortalidad son las infecciones del torrente sanguíneo (BSIs). Las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo conforman del 5 % al 15 % de todas las infecciones hospitalarias, y en Estados Unidos de América (EUA) afectan al menos a 120,000 pacientes anualmente. La tasa de mortalidad atribuible a las BSIs oscila entre el 21 % y 31 %. Wey *et al.* (4) determinó la tasa de mortalidad atribuible a las candidemias y estimó el exceso en la duración de la estancia hospitalaria causada por este tipo de infecciones. Se examinaron las tasas de mortalidad cruda, atribuible y el exceso de duración en la estancia hospitalaria en 88 casos y controles con enfermedades ocurridas entre julio de 1983 y diciembre de 1986. La mortalidad cruda para casos y controles fue de 57 % y 19 %, respectivamente; así, la tasa de mortalidad atribuible fue de 38 % (4).

2.2 Micosis oportunistas

Aunque existen muchos agentes causantes de micosis oportunistas y la lista se mantiene en constante crecimiento, el género más importante a la fecha es *Candida* spp. (3).

Un estudio epidemiológico de sepsis en EUA encontró que el número anual de casos de sepsis causados por organismos fúngicos incrementó 20 % entre 1979 y 2000. En el estudio SCOPE (Vigilancia y Control de Patógenos de Importancia Epidemiológica), un estudio de 24, 179 infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo procedentes de 49

centros entre 1995 y 2002, 9.5 % de las infecciones fueron de origen fúngico. *Candida* spp. fue la cuarta causa de BSIs, superado sólo por estafilococos y enterococos. Notablemente, en un estudio poblacional de candidemia, Sofair *et al.* determinaron que el 31 % de 1,143 casos de candidemia fueron infecciones adquiridas en la comunidad. La incidencia anual de candidosis (en California, EUA) es de entre 72 y 290 infecciones por millón de personas (3).

Programas de vigilancia epidemiológica longitudinales de diversos centros médicos de todo el mundo documentan la creciente relevancia clínica de las levaduras del género *Candida* como la mayor causa de fungemia (5).

2.3 Candidosis

Pfaller *et al.* indicaron que, aunque el género *Candida* contiene más de 200 distintas especies, hay cinco especies principales (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*) que representan entre el 95 % y el 97 % de las infecciones humanas (6). En la mayoría de los casos el orden de incidencia es *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y, por último, *C. krusei*. De éstos últimos, *C. albicans* es la especie más comúnmente recuperada de material clínico y generalmente es responsable del 90 % al 100% de las infecciones de mucosas y del 40 % al 70 % de los episodios de candidemia, aunque esto puede variar considerablemente de acuerdo al servicio clínico en el cual el paciente ha sido hospitalizado, la ubicación geográfica y el grupo de riesgo (3,5,7-9).

Respecto a lo anterior, la candidemia es la enfermedad fúngica invasiva más frecuente en todas las latitudes. La incidencia de la candidemia se incrementó a partir de la década de 1980, coincidiendo con importantes avances médicos y quirúrgicos en el tratamiento de neoplasias y el trasplante de órganos, además del incremento en la población inmunocomprometida. Desde hace una década esta incidencia se mantiene estable o ha disminuido en algunas instituciones gracias a las mejoras diagnósticas y terapéuticas. Sin embargo, la mortalidad asociada a la candidemia no ha descendido de manera significativa.

Las candidosis invasivas (CI) están entre las más frecuentes infecciones de casos asociados al cuidado de la salud y conducen a una significativa morbilidad y mortalidad. En los EUA, *Candida* spp. es la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en hospital y la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (8). *Candida* spp. es la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo asociadas al uso de catéter y la segunda causa de infecciones del tracto urinario asociadas a catéter en EUA (6,10,11).

Las infecciones por *Candida* spp. representaron el 88 % de todas las infecciones fúngicas nosocomiales en EUA entre 1980 y 1990. *Candida* spp. representó el 75 % de las infecciones fúngicas invasivas en pacientes hospitalizados. Sin embargo, la frecuencia de *Candida* asociada a infecciones fúngicas invasivas varió de acuerdo al servicio clínico y la condición subyacente del paciente (3). Zilberberg *et al.* encontraron que la incidencia de candidemia aumentó un 52 % entre 2000 y 2005 (12). Wilson *et al.* y Pfaller y Diekema, usaron los datos del *National Hospital Discharge Survey* (NHDS) para demostrar que los estimados de incidencia de CI se habían mantenido o aumentado entre 1996 y 2003 en 22 a 29 infecciones por cada 100,000 personas. La fuente de infección predominante para

Candida spp., desde mucosas superficiales y enfermedades cutáneas hasta diseminación hematológica, es el paciente. Se sabe que la mayoría de los tipos de candidosis representan infección endógena en las cuales la microbiota comensal toma ventaja para causar enfermedad. La transmisión de *Candida* spp., de trabajadores de la salud a pacientes y de paciente a paciente se encuentra bien documentada, especialmente en el ambiente de UCI. Las manos de los trabajadores de la salud fungen como potenciales reservorios para la transmisión nosocomial de *Candida* spp. (3,13,14).

En un programa internacional de vigilancia epidemiológica de BSIs en los EUA, Canadá y Sudamérica entre enero y diciembre de 1997 detectaron 306 episodios de candidemia en 34 centros médicos. El 80 % de las BSIs fueron nosocomiales y el 50 % ocurrió en pacientes hospitalizados en una UCI. En total, 53.3 % de las BSIs fueron debidas a *C. albicans*, 15.7 % debidas a *C. parapsilosis*, 15 % debidas a *C. glabrata*, 7.8 % debidas a *C. tropicalis*, 2 % debidas a *C. krusei*, 0.7 % debidas a *C. guilliermondii*. Sin embargo, la distribución de especies fue notablemente desigual por país. En EUA, 43.8 % de las BSIs fueron debidas a especies NCA. *C. glabrata* fue la especie NCA más común en EUA. Se observó resistencia a fluconazol ($\text{CMI} \geq 64 \mu\text{g/mL}$) y a itraconazol ($\text{CMI} \geq 1.0 \mu\text{g/mL}$) con *C. glabrata* y *C. krusei*. En contraste, 8.7 % de los aislamientos de *C. glabrata* y 100 % de los aislamientos de *C. krusei* fueron resistentes a fluconazol (15).

Hajjeh *et al.* mostraron que, el porcentaje de infecciones del torrente sanguíneo por *Candida* adquiridas en la comunidad en EUA incrementó cerca de un 10 % entre 1992 y el 2000 (16).

En EUA entre el 2000 y 2005 se reportó un incremento del 52 % en la tasa de candidemia durante este periodo (6).

Datos del Sistema de Vigilancia Nacional de Infecciones Nosocomiales (NNIS) indican que el 8 % de todas las BSIs son causadas por especies de *Candida*. Además, a pesar de la intensa investigación en el mejoramiento de técnicas, la sensibilidad para detectar *Candida* spp. en cultivos de sangre es del 50 %. Por lo tanto, las BSIs por *Candida* pueden ser muy subdiagnosticadas y subreportadas. Una vez considerada como una infección nosocomial primaria, adquirida más comúnmente en UCIs, la candidemia es ahora encontrada en unidades de hospitalización de medicina general, así como en la comunidad (8).

Según la Secretaría de Salud de México, para el año 2012 la candidemia, sigue siendo la CI diagnosticada más frecuentemente. El programa internacional de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2008-2009, reportó 1,752 casos de candidemia, el 44.5 % ocurrió en pacientes hospitalizados en unidades de terapia intensiva, mientras que el 55.4 % en pacientes cuya estancia fue en otro sitio. En el caso particular de las unidades de terapia intensiva, *C. albicans* fue responsable del 50.4 % de los episodios de candidemia, seguido por *C. glabrata* en el 17.5 %, *C. parapsilosis* el 15.1 %, *C. tropicalis* 10.5 %, *C. krusei* 2.1 % y otras especies el 4.4 %. La distribución de los episodios en pacientes no hospitalizados en la unidad de terapia intensiva se comportó de forma similar, *C. albicans* 47.4 % de los episodios de candidemia, *C. glabrata* en el 18.1 %, *C. parapsilosis* el 18.9 %, *C. tropicalis* 9.6 %, *C. krusei* 2.1 % y otras especies el 4.0 % (14).

En su estudio, Wisplinghoff *et al.* demostraron que *C. albicans* fue la especie más prevalente representando 611 (50.7 %) de todos los aislamientos, seguido de *C. parapsilosis* (210; 17.4 %), *C. glabrata* (201; 16.7 %) y *C. tropicalis* (123; 10.2 %); 61 BSIs (5.1 %) fueron causadas por otras especies de *Candida* (10).

Las complicaciones de la candidemia resultan de la diseminación hematológica de la infección y pueden provocar enfermedades en cualquier tejido u órgano. Otras complicaciones de la candidemia incluyen endocarditis, meningitis y osteomielitis (8).

Pese a que ahora tenemos un entendimiento básico de la tendencia de distribución de las especies y la susceptibilidad antifúngica dentro de los aislamientos de *Candida* causales de BSIs en EUA, hay una carencia de información por parte de otros países, incluido México (15,17).

2.4 Factores de riesgo para candidemia

Ciertos pacientes hospitalizados se encuentran en alto riesgo de adquirir candidemia durante su hospitalización, como resultado de su condición médica subyacente: pacientes con neoplasia hematológica y/o neutropenia, falla renal, aquellos sometidos a cirugía gastrointestinal, infantes prematuros y pacientes mayores de 70 años. En este sentido, Chang *et al.* exponen que infantes menores de 1 año de edad y adultos mayores de 65 años tienen las más altas tasas de candidemia (8).

Pemán *et al.* manifestaron que el daño de las barreras anatómicas y fisicoquímicas, como ocurre durante las intervenciones quirúrgicas o la inserción de catéteres intravenosos o sondas urinarias, facilita la entrada de *Candida* en la circulación sanguínea y su posterior diseminación a diferentes órganos (9).

En concordancia con esto, los grupos de alto riesgo incluyen individuos sometidos a trasplantes de células madre hematopoyéticas, trasplante de órganos sólidos, cirugías mayores (especialmente cirugía gastrointestinal), diálisis, aquellos con SIDA,

enfermedades neoplásicas, terapia inmunosupresora, edad avanzada, nacimiento prematuro y ventilación mecánica. Factores de riesgo adicionales incluyen: exposición a agentes antimicrobianos de amplio espectro, corticosteroides, colonización mucosa con *Candida* spp., agentes quimioterapéuticos citotóxicos, el uso prolongado de catéteres intravasculares, estancia prolongada en la UCI y la nutrición parenteral total (3,14).

Pemán *et al.* explicaron que el uso de antibióticos de amplio espectro influye de manera que modifica la microbiota, facilitando la proliferación y aumento de la población celular de *Candida*, propiciando un desequilibrio con las defensas del hospedero, lo cual incrementa el riesgo de translocación intestinal y el paso de *Candida* al torrente sanguíneo. En este sentido, se ha descrito una mayor colonización de *Candida* spp. en la boca y en el aparato digestivo en personas que han recibido antibioticoterapia (9).

Según Pfaller y Diekema *et al.*, dentro de los pacientes con candidemia en EUA, la media de tiempo para el inicio de la candidemia fue de 22 días de hospitalización. En consecuencia, se debe enfatizar, en primer lugar, que la CI típicamente afecta individuos con enfermedades severas, los cuales habitualmente tienen hospitalizaciones prolongadas (3). Comparado con los controles sin los factores de riesgo específicos, la probabilidad de estos pacientes con alto riesgo de contraer candidemia en un hospital es aproximadamente 2 veces mayor por cada clase de antibióticos que reciben, 7 veces mayor si tienen catéter, 10 veces mayor si han encontrado *Candida* colonizando otros sitios anatómicos y 18 veces más grande si el paciente se somete a hemodiálisis. La hospitalización en la UCI provee la oportunidad para la transmisión de *Candida* entre pacientes. Notablemente, el factor de riesgo más importante para la candidemia entre los pacientes hospitalizados en la UCI quirúrgicos es la estancia prolongada (>7 días) (3,7).

Se han descrito infecciones nosocomiales cruzadas por contacto entre pacientes o a partir de una persona colonizada o infectada a otra a través de las manos del personal sanitario o de fómites. Sin embargo, un tercio de las CI se diagnostican en pacientes ambulatorios (9).

Se ha visto que algunos de estos factores de riesgo específicos se asocian a una probabilidad de infección por cierta especie de *Candida*. Por ejemplo, recientemente se ha indicado que aumenta la incidencia de infección con *C. glabrata* a medida que aumenta la edad del paciente. Pacientes mayores de 60 años tienen mayor probabilidad de infección con *C. glabrata*. Otros factores de riesgo propuestos para infecciones por *C. glabrata* son la exposición a agentes antibacterianos como piperacilina-tazobactam y vancomicina, y la gravedad de la enfermedad subyacente (8).

2.5 Mortalidad, tiempo de estancia hospitalaria y costo hospitalario por candidemia

A pesar de que la CI no es tan prevalente como las infecciones por estafilococos, algunos de los factores que distinguen a las infecciones por *Candida* spp. de las infecciones bacterianas es la elevada mortalidad de la CI, los altos costos asociados y la incrementada duración de la estancia hospitalaria del paciente. Por todo esto, representa un grave problema de salud pública (10,19).

El impacto clínico y económico de la CI se sitúa entre las infecciones hospitalarias de mayor mortalidad y elevados costos a nivel mundial. Además, ahora es evidente que el tratamiento eficaz de la CI casi siempre se retrasa más de 24 h con el consiguiente aumento de los costos de salud y la mortalidad (7).

Pfaller *et al.* precisaron que pacientes con candidemia han mostrado estar dos veces en mayor riesgo de muerte durante su hospitalización que aquellos pacientes con BSI no debidas a *Candida*. La evidencia de estudios previos sugiere que la candidemia o la CI están asociadas con una importante mortalidad atribuible que va desde el 10 % hasta el 49 %, mientras otros autores consideran que los porcentajes van desde el 30 % al 80 % en casos de candidemia y del 10 % al 20 % de los pacientes morirán de alguna enfermedad subyacente (7–10). Wenzel y Gennings estimaron la carga anual de candidemia en 10,500 a 42,000 infecciones en EUA, asociado con 2,800 a 11,200 muertes por año (20).

La tasa de mortalidad incrementa 1,025 veces por cada hora de incubación del hemocultivo. Un retraso de 24 h en el resultado positivo del cultivo efectivamente dobla las posibilidades de riesgo de muerte (7). Estos datos además demuestran que la frecuencia de infecciones y la mortalidad asociada a las mismas no ha decrecido en las pasadas dos décadas a pesar de la introducción de nuevos triazoles de amplio espectro y equinocandinas para su uso en profilaxis, terapia empírica y dirigida, éstas con buena actividad contra la mayoría de las especies de *Candida* (7). El tratamiento de candidemia frecuentemente falla debido a la demora en la administración de la terapia, al tratamiento con un agente al cual el organismo es resistente, a una dosis o duración inadecuada del tratamiento o ningún tratamiento en absoluto. Muchos estudios han demostrado que retardos de >12 h, >24 h y >48 h en el inicio de terapias antifúngicas, son independientemente asociados con mortalidad en pacientes con candidemia (3,7).

Pfaller y Castanheira afirmaron que, mientras que la infección por *Candida* se produce generalmente en pacientes con un gran número de comorbilidades, el exceso de mortalidad (49 %) y la duración de la estancia en el hospital (30 días) exceden las de la

mayoría de otras infecciones asociadas al cuidado de la salud. Del mismo modo, los costos asociados a la infección por *Candida* (oscilan de \$6,214 a \$142,394 dólares por paciente), encontrándose entre los más altos de cualquier infección asociada al cuidado de la salud (7).

Chang *et al.* reportan un estimado del incremento en la duración de la estancia de 4.3 a 30 días y un excesivo costo de \$6,200 a \$92,000 dólares con un costo promedio total superior a los \$40,000 dólares por caso de candidemia (8,14).

Otro estudio de candidemia encontró que la remoción de catéteres vasculares, además de la recepción de cinco días de tratamiento antifúngico, fueron asociados con un decremento en el riesgo de mortalidad temprana y tardía. Igualmente, otro estudio encontró que la retención de catéteres endovenosos y una inadecuada dosificación de fluconazol se encontraban asociados con un incremento en la mortalidad en pacientes con BSI por *Candida* (7).

Garey *et al.* (2006) demostraron la importancia del momento del inicio del tratamiento, en su estudio, la tasa de mortalidad fue menor cuando la terapia antifúngica se inició en el día 0 (15 %) comparado con aquellos que iniciaron el día 1 (24 %), al día 2 (37 %) y días después (41 %) (21).

Morell *et al.* en su estudio encontraron que la administración de terapia antifúngica a las 12 h o antes del primer hemocultivo positivo fue un marcador independiente de mortalidad hospitalaria (22).

2.6 Diagnóstico de candidosis

Pfaller *et al.* (2016) comentan que es ampliamente reconocido que el diagnóstico temprano de candidosis es difícil. Los signos y síntomas no son específicos y seguido aparecen tarde en el curso de la infección (7). El diagnóstico puede realizarse de distintas maneras, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos tradicionales de diagnóstico para la candidosis. Modificado de Pfaller y Castanheira (7).

1- Examen físico	Puede realizarse en pacientes no neutropénicos un examen oftalmológico con dilatación de pupila para detectar endoftalmitis por <i>Candida</i> y puede servir para guiar la terapia en pacientes con candidemia establecida. Además, un examen diario de la piel puede revelar lesiones sugestivas de diseminación hematógena (con una biopsia posterior).
2- Cultivo de sangre (hemocultivo)	La técnica de referencia para el diagnóstico de las micosis invasivas, a pesar de sus limitaciones: su sensibilidad no supera el 50-70 % y el tiempo requerido desde la toma de la muestra hasta la identificación del hongo aislado y el estudio de la susceptibilidad del agente causal es de 48-72 h, en el mejor de los casos (9,11,18,23).
3- Pruebas diagnósticas independientes de cultivo	β -D-glucano, anticuerpos antimanano o antígeno manano o PCR (los más usados 18S, 5.8S y 28S ribosomales; y la región espaciadora interna transcrita [ITS]).

Según Pemán *et al.*, debido a la falta de sensibilidad y rapidez diagnóstica, en los últimos años se han desarrollado técnicas más sofisticadas, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Nuevas tecnologías diagnósticas para la candidosis. Modificado de Pemán *et al.* (9)

PNA-FISH <i>Yeast Traffic Light</i> :	Es rápida (90 min) y con elevada sensibilidad (92-100 %) y especificidad (95-100 %). Su costo puede ser una limitación importante para su uso en la práctica diaria.
MALDI-ToF MS	Permite la identificación precisa en menos de 30 min de los aislamientos fúngicos en medios de cultivo sólido. Debido a su exquisita sensibilidad, esta herramienta podría ser utilizada para la detección directa de patógenos a partir del material clínico.
1,3- β -D-glucano (BG)	Es un marcador panfúngico, por lo que un resultado positivo no permite identificar al patógeno causante de la enfermedad fúngica invasora. En la candidemia y la CI el valor predictivo negativo del BG es superior al 90 %, por lo que es muy útil para descartar la infección cuando se realizan determinaciones seriadas y puede adelantar en siete días al diagnóstico por hemocultivo.
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	La elevada sensibilidad teórica de las técnicas de detección de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa no se ha confirmado en la práctica clínica. Sin embargo, se han publicado varios metaanálisis que muestran una sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la candidemia del 92 % y del 95 % respectivamente.

2.7 Cambio epidemiológico hacia especies NCA

Pfaller *et al.*, explican que la carencia en la identificación de especies podría haber sido responsable de las tendencias del pasado cuando *C. albicans* era la especie dominante y la elección de terapia antifúngica era limitada a la anfotericina B. Aunque algunos autores consideran que *C. albicans* continúa siendo la especie predominante en los casos de candidemia (6,8), otros autores aseveran que ahora hay más infecciones por especies NCA, alcanzando hasta el 50 % (9,24), en países como EUA y Alemania (10), y en la mayoría de los hospitales atendiendo a pacientes de alto riesgo, por esto, la elección de agentes antifúngicos ahora abarca varias clases y distintas formulaciones. El incremento en las infecciones por especies NCA, a partir de los años noventa (6), es debido principalmente al extenso uso del fluconazol, el cual, selecciona aquellas especies que son intrínsecamente menos susceptibles a este agente que *C. albicans* (5,8). Además, los perfiles de resistencia antifúngica específicos de cada especie ahora son bien conocidos. Sin embargo, en pacientes que acumulan factores de riesgo de candidemia, en quienes la probabilidad de candidemia es alta, los médicos usan terapia empírica prolongada antes de los resultados de laboratorio sobre identificación de especie y susceptibilidad antifúngica (18). Es claro que los patrones de susceptibilidad *in vitro* varían sustancialmente entre las diferentes especies de *Candida*. En particular, la aparición de cepas de *C. glabrata* resistentes a múltiples fármacos (resistente a dos o más clases antifúngicos) en EUA, América Latina, Italia, Francia, Dinamarca y *C. tropicalis*, *Candida auris*, y *C. krusei* en la India sirven para subrayar la importancia de los esfuerzos regionales y locales de vigilancia epidemiológica (7).

Con el fin de instaurar un tratamiento efectivo, es esencial tener un conocimiento válido y actualizado de la proporción de especies de *Candida* causantes de candidemia a nivel geográfico. Se ha observado una variabilidad significativa en la frecuencia relativa de candidemia en diferentes regiones dentro de un país dado. Además, una variabilidad significativa se ha notado dentro de estudios, especialmente en estudios multicéntricos incluyendo pacientes en distintas condiciones (ej. UCI, pacientes ambulatorios, etc.) y estudios que duran largos periodos, los cuales reportan distribuciones distintas de especies de *Candida*, no sólo dentro de las regiones, sino a través del tiempo (6,18).

Wisplinghoff *et al.*, en su estudio, colectaron 1,218 aislamientos de infecciones del torrente sanguíneo por *Candida* procedentes de 52 hospitales en EUA entre 1998 y 2006. *C. albicans* fue la especie más prevalente (50.7 %), seguida por *C. parapsilosis* (17.4 %), *C. glabrata* (16.7 %) y *C. tropicalis* (10.2 %). Mencionaron que la proporción de NCA incrementó significativamente con el tiempo (1998-2002 vs. 2003-2006) (10).

Diversos autores aseguran que *C. albicans* sigue siendo el patógeno predominante en las candidemias en general. Sin embargo, la epidemiología local puede ser sorprendentemente diferente (6,8,9). En su estudio, Falagas *et al.* observaron que la epidemiología de la candidemia es considerablemente diferente en distintas partes del mundo, pero parece que sigue patrones específicos. En general, *C. albicans* es el patógeno predominantemente aislado en norte y centro de Europa y en EUA. Por otro lado, las especies NCA predominan en Asia, sur de Europa, y Sudamérica. Las proporciones más altas de *C. glabrata* fueron reportadas en Europa del norte y central. Pemán *et al.* especifican que los países europeos que han registrado el incremento de infecciones por *C. glabrata* son Alemania, Francia, Reino Unido y los países escandinavos. Sin embargo, en

América Latina, España y otros países mediterráneos europeos *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* se aíslan con mayor frecuencia en los hemocultivos que *C. glabrata* (9).

Se obtuvieron datos sobre cambios en la frecuencia relativa de especies de *Candida* aisladas de sangre en 12 estudios multicéntricos de vigilancia epidemiológica. De manera resaltable, se reportó un incremento en la frecuencia de *C. glabrata* en cinco estudios, todos realizados en Europa y EUA. La variación geográfica puede ser un reflejo de las prácticas clínicas en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, la alta incidencia de *C. glabrata* en estudios de EUA y partes de Europa puede ser el resultado del uso extensivo de fluconazol tanto para profilaxis como tratamiento durante los años pasados (18,25,26). Sin embargo, en algunos países europeos como Francia, Italia y Suiza, y países asiáticos como Taiwán, las infecciones por *C. glabrata* no han incrementado en la misma medida (8).

2.8 Complejo *Candida glabrata*

C. glabrata, es una levadura haploide y asexual, que vive como comensal en superficies mucosas como boca y tractos gastrointestinal, urinario y vaginal en humanos, donde forma parte del microbioma y en la mayoría de los individuos no causa enfermedad. (27,28). Por otro lado, bajo condiciones adecuadas, *C. glabrata* puede cambiar para convertirse en un patógeno oportunista causante de micosis superficiales y profundas. Sin embargo, la proporción real de la colonización asintomática no es bien conocida (5,28).

Una pregunta recurrente es el grado de relación en que *C. glabrata* se asocia con los seres humanos. A pesar de que la especie fue descrita por primera vez como un comensal del intestino humano, y que recurrentemente aparece en los estudios de microbioma

humano oral e intestinal, el hecho es que carecemos de información de si también está presente en algunos nichos ambientales (1). Además, su prevalencia en la boca y el intestino humano es generalmente mucho menor que la de *C. albicans* e incluso *Saccharomyces cerevisiae*, y puede estar asociada con edades más avanzadas. De hecho, un estudio reciente encontró que solo un 15 % de individuos mayores a 40 años fueron portadores de *C. glabrata* como comensal, este porcentaje aumenta a partir de los de 60 años de edad (29).

El aumento en la proporción de las BSIs está siendo provocado por *C. glabrata*, quien ahora causa casi el 30 % de los casos en EUA y es la especie más común de infecciones fúngicas invasivas entre las especies NCA en América del Norte (6) y centro de Europa (30). Falagas *et al.* informaron que un incremento en la frecuencia relativa de *C. glabrata* fue reportado en cinco estudios, todos conducidos en las regiones antes mencionadas (18).

Trick *et al.* ha demostrado que, entre las especies de *Candida*, *C. glabrata* sola ha aumentado como causa de BSIs en EUA en UCI desde 1993 (24). En este sentido, una revisión de programas de vigilancia fúngica realizados en EUA (SENTRY, PATH y CDC [Centers for Disease Control and Prevention]) de 1992 al presente, muestra que la proporción de BSIs debidas a *C. glabrata* ha incrementado significativamente del 8-12 % en 1992 y del 24-26 % en 2004-2008 (3).

C. glabrata es frecuentemente aislada en infecciones del torrente sanguíneo en distintos servicios clínicos como medicina general, malignidad hematológica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, trasplantes de células madre, trasplante de órganos, tumores sólidos o cirugía general (9). Esta levadura afecta principalmente a pacientes mayores,

pacientes con cáncer, diabéticos o individuos previamente expuestos a azoles y equinocandinas, y es una de las especies más comunes asociadas con BSIs entre individuos mayores de 70 años (5,7,18,31). Apoyando esta idea, numerosos estudios han mostrado que colonización e infección con *C. glabrata* son raros entre los infantes y niños e incrementan significativamente con la edad del paciente.

Las tasas de mortalidad son más altas en infecciones causadas por *C. glabrata* que en infecciones por *C. albicans*, alcanzando el 50 %. Esto está relacionado a la enorme adaptación a los ambientes que puede presentar *C. glabrata*, ya que se sabe que puede colonizar en muchos nichos del hospedero. A fin de sobrevivir y proliferar, usa numerosos mecanismos, permitiendo su exitosa adaptación como patógeno, esto incluye la habilidad de soportar largos periodos de inanición de carbono y hierro desde la fagocitosis por macrófagos, así como un bajo pH ambiental en la vagina o los fagolisosomas y estrés oxidativo (5). Finalmente, el estrés es causado por el desafío con drogas antifúngicas usadas en tratamientos médicos, así como interacciones competitivas con otros microorganismos. Estas condiciones probablemente afectan en la baja susceptibilidad intrínseca de *C. glabrata* al fluconazol, la cual puede desarrollarse rápidamente a una resistencia de alto nivel durante el curso del tratamiento médico. Por lo tanto, las infecciones causadas por *C. glabrata* son difíciles de erradicar y se asocian con una mortalidad significativa (5).

Con base en las técnicas de PCR y secuenciación, se han descrito dos nuevas especies que se encuentran estrechamente relacionadas y son fenotípicamente similares a *C. glabrata*, éstas son: *C. nivariensis* y *C. bracarensis* (32,33).

Swoboda-Kopeć *et al.* declararon que las pruebas bioquímicas de rutina no permiten diferenciar las dos nuevas especies, lo que lleva a errores de identificación, por lo tanto, su significancia clínica es subestimada y su porcentaje entre las cepas clínicas de *Candida* permanece subvalorado. Pese a que *C. glabrata* es parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal humano, los nichos ecológicos de *C. nivariensis* y *C. bracarensis* permanecen desconocidos (34).

El cambio fenotípico (descubierto por Lachke *et al.*) ocurre en *C. glabrata* de manera similar que en otros hongos levaduriformes. En *C. glabrata* se manifiesta como la habilidad de producir colonias de colores distintos en agares cromogénicos. Los diagnósticos micológicos de rutina se basan en la morfología fúngica. Estos métodos no son muy eficientes para la discriminación de las nuevas especies del complejo *C. glabrata*. Sin embargo, estudios actuales sobre estos microorganismos sugieren que en colonias blancas se realicen pruebas de identificación posteriores (34). A pesar de que especies del complejo *C. glabrata* están relacionadas filogenéticamente, las técnicas de PCR y de secuenciación de ADN permiten una diferenciación completa de las especies. La secuenciación de la región D1/D2 del gen del ARN ribosomal 26S proporciona resultados únicos en la identificación de especies estrechamente relacionadas (34).

Alcoba-Flores *et al.* en el 2005, identificaron tres aislamientos clínicos atípicos de *C. glabrata*. Sus aislamientos atípicos no formaron tubos germinales, clamidosporas, pseudohifas o ascosporas, incluso después de un largo periodo de incubación. Los tres aislamientos atípicos de *Candida* y *C. glabrata* ATCC 90030 crecieron en agar dextrosa de Sabouraud (SDA) y caldo extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) a 30 y 37°C, pero no a 45°C. No obstante, en contraste con *C. glabrata*, sus tres aislamientos no mostraron

turbidez en caldo YPD. En CHROMagar, los aislamientos atípicos de *C. glabrata* dieron colonias blancas, mientras que las cepas de *C. glabrata* de referencia fueron típicamente rosadas. Por otra parte, a diferencia de *C. glabrata*, los aislamientos atípicos fueron capaces de fermentar trehalosa. Los aislamientos atípicos fueron susceptibles a cicloheximida y no fueron capaces de hidrolizar esculina. Estos autores propusieron que los tres aislamientos atípicos representaban una nueva especie: *C. nivariensis* (33). Ellos describieron por primera vez a la especie *C. nivariensis* en 2005 después de que fue aislada a partir de muestras clínicas (lavado bronquioalveolar, cultivo de sangre y orina) de tres pacientes en las Islas Canarias, islas africanas bajo el dominio español (33). Los análisis MALDI-ToF demostraron después, ser una herramienta útil para diferenciar estas especies. Desde entonces, se ha informado de otros casos en Europa (34,35), Asia (36–39), Australia (40) y América (41,42). El número total de aislamientos de *C. nivariensis* por estudio descrito en la literatura ha sido baja en estos países (41).

El primer aislado ambiental de *C. nivariensis* fue procedente de la superficie de plantas. Posteriormente, *C. nivariensis* fue descrito como el factor etiológico de casos de candidemia y candidosis orofaríngea. Los aislamientos subsecuentes de lugares profundos y usualmente estériles han establecido que este patógeno se encuentra frecuentemente en aislamientos clínicos y es un factor etiológico crucial de infecciones humanas (34,37).

Aislamientos de *C. nivariensis* en América Latina han sido registrados en Argentina y Brasil, ambos en 2016, por Morales-López *et al.* (42) y Figueiredo-Carvalho *et al.* (41). El estudio de Argentina arrojó únicamente 2.56 % de cepas de *C. nivariensis*, similar a otros estudios internacionales (38–40).

Por otra parte, *C. braccarensis* fue descrita por primera vez en Portugal en el 2006 a partir de muestras de exudado vaginal y sangre. Es un mimetista de *C. glabrata* y también se sugiere que puede tener una amplia distribución geográfica, desde que se han recuperado especímenes clínicos de Portugal, el Reino Unido, Brasil y EUA. Estudios adicionales de múltiples localidades geográficas son necesarios para descubrir la epidemiología de infección, colonización y patrón de susceptibilidad antifúngica de *C. braccarensis* (43).

En el agar levadura malta (YM), las colonias de cultivo son umbonadas, color crema pálido, brillante y con un margen completo. No presenta pseudohifas ni hifas verdaderas en agar harina de maíz después de 21 días a 25 °C. Fermenta la glucosa y la trehalosa. Asimila sacarosa, α -trehalosa, glicerol, D-glucano-1,5-lactona y D-gluconato. El único compuesto nitrogenado asimilado por esta especie es la L-lisina. Crece en presencia de cicloheximida al 0,1 % y a 42 °C. La cepa estudiada se aisló de un caso de candidosis vaginal en una institución médica en Braga, Portugal (32).

Bishop *et al.* reportaron tres aislamientos clínicos de *C. braccarensis* en EUA identificados mediante de PNA-FISH y secuenciación de la región D1/D2. Un hallazgo importante de su trabajo es que uno de los tres pacientes de los cuales se aisló *C. braccarensis* tenía evidencia de una presunta infección profunda; la cepa fue el agente causal de vaginitis. Este fue el primer reporte del aislamiento de *C. braccarensis* de un sitio anatómico profundo y apoya la suposición de infección desde que el organismo fue colectado directamente de un absceso y no de tubos de drenaje. Otro hallazgo importante fue que, una cepa de *C. braccarensis* aislada de garganta de uno de los pacientes fue resistente a fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol (43).

En 2016 fue el primer reporte de *C. bracarensis* en Latinoamérica por Figueiredo-Carvalho *et al.* en Brasil. Ellos identificaron por secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y los dominios D1/D2 una cepa procedente de un paciente con linfoma (41).

Poco es conocido sobre la susceptibilidad de las nuevas especies (*C. nivariensis* y *C. bracarensis*) a los antifúngicos. Algunos investigadores recalcan que éstas podrían ser más resistentes a los antifúngicos que *C. glabrata* (35). La resistencia heterogénea a los azoles y las diferencias en la virulencia de las especies dentro del complejo *C. glabrata* podrían resultar en una pobre identificación de las especies derivado a partir de una falta de conocimiento en los cambios taxonómicos (34).

2.9 Susceptibilidad antifúngica en *Candida glabrata*

El CDC ha notado un incremento considerable en la incidencia de infecciones por *Candida* debido a cepas resistentes a azoles y equinocandinas, y considera esto como un serio problema en la salud pública. Ahora, hay preocupación respecto a la resistencia de tres especies comunes de *Candida*: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (7).

C. glabrata es uno de los principales patógenos fúngicos de humanos que causa infecciones que ponen en peligro la vida y plantea un desafío a las opciones de terapia antifúngica debido a su habilidad para rápidamente desarrollar resistencia a los derivados azólicos y equinocandinas, mientras la resistencia de *C. glabrata* frente a otros agentes como anfotericina B y flucitosina ocurre más raramente (28). Esta resistencia a antifúngicos se encuentra relacionada a la exposición previa de cepas a antifúngicos específicos (7).

Considerando que el fluconazol es el agente antifúngico sistémico más comúnmente prescrito, su uso indiscriminado puede ser peligroso. Estudios demostraron una alta prevalencia de dosis de fluconazol debajo de las óptimas dadas empíricamente o después de la identificación de *Candida*. Pfaller y Castanheira encontraron un 78 % de pacientes infectados con *C. glabrata* que recibieron fluconazol a una dosis menor a la recomendada (12 mg/kg/día). Tales prácticas de dosificación son probablemente causales del impacto en las tasas de resistencia (7).

Los azoles, que incluyen al ketoconazol, itraconazol y fluconazol, han sido el pilar de la terapia antifúngica y profiláctica por muchos años. Los azoles inhiben el citocromo P450 involucrado en la biosíntesis del ergosterol, incrementa la fluidez de membrana, lo cual dispara un severo estrés de membrana y afecta la función de numerosas proteínas de membrana. Por otro lado, las equinocandinas interrumpen la biogénesis de la pared celular. Esta clase de drogas antifúngicas comprende la micafungina, anidulafungina y caspofungina (5).

Según Vale-Silva *et al.* la resistencia al fluconazol dentro de los aislamientos de *C. glabrata* varía de 13 % en la región Asia-Pacífico a un 19.5% en Norte América. En EUA la resistencia a fluconazol de *C. glabrata* ha incrementado del 9 % entre 1992 y 2001 al 14 % de 2001 a 2007 (28).

Por otro lado, Phaller y Castanheira consideran que el porcentaje de resistencia al fluconazol ahora alcanza el 30 % de todos los aislamientos en muchas áreas de EUA y se considera que, a nivel mundial, la proporción varía del 5 % al 20 %, dependiendo del área geográfica (7).

El fluconazol debe ser usado en la mayoría de las situaciones, reservando las equinocandinas para los casos más serios y pacientes clínicamente inestables. Igualmente, *C. glabrata* y *C. krusei* se agrupan juntas con base en su baja susceptibilidad al fluconazol. Actualmente, *C. glabrata* muestra susceptibilidad dosis-dependiente o resistencia y ya no es considerada como susceptible a los azoles (5).

Para sobrevivir a la presencia de drogas tóxicas, las células fúngicas han adquirido diversos mecanismos, incluyendo la alteración del sitio diana del fármaco, reducción de la absorción del mismo, así como su expulsión activa (5).

En contraste con *C. albicans* y otras especies NCA, la resistencia a los azoles tanto inherente como adquirida en *C. glabrata* se basa predominantemente en la incrementada actividad de expulsión del fármaco. Esto debido a la elevada expresión de los genes codificantes del transportador multidroga ABC, *CgCDR1*, *CgCDR2* y *CgSNQ2*. La sobreexpresión de un solo gen de transportador ABC o múltiples genes del transportador multidroga ABC en aislamientos clínicos de *C. glabrata* resulta de ganancias espontáneas de función por mutaciones en el factor de transcripción *CgPDR1*, un homólogo de *PDR1* y *PDR3* de *S. cerevisiae* (5).

La activación de mutaciones de *CgPDR1*, además de contribuir a la resistencia a azoles *in vitro* e *in vivo*, modula la interacción con las células del hospedero. Las mutaciones por ganancias espontáneas de función en *CdPDR1* se han asociado con un incremento en virulencia en modelo murino de candidosis diseminada en comparación con alelos *wildtype* y aumentan la adhesión en líneas celulares epiteliales, lo cual facilita la colonización inicial del hospedero. Incluso, mutantes por ganancias espontáneas de función

en *CdPDR1* pueden propiciar la evasión del sistema inmune por la reducción de la adhesión y captación por macrófagos (5).

Las equinocandinas, por otro lado, son lipopéptidos derivados a partir de un producto original sintetizado por un hongo conocido como *Glarea lazayensis*. Su mecanismo de acción radica en la inhibición de la 1,3- β -glucanosintetasa, enzima responsable de formar polímeros de glucano, esenciales para la estructura de la pared celular fúngica. La inhibición de esta enzima, presente en la mayoría de los hongos y ausente en las células de origen humano, lleva consigo una disminución de la síntesis del glucano, permitiendo que la célula fúngica entre en fase de inestabilidad osmótica y posterior muerte (44). Sin embargo, la resistencia a la clase de las equinocandinas, la cual fue introducida a finales de los 90's, está aumentando en muchas instituciones y oscila entre el 3 % y 18 % en instituciones que dan cuidado a pacientes de alto riesgo (7,28).

En aislamientos clínicos de *C. glabrata*, la resistencia a equinocandinas involucra mutaciones en los genes *CgFKS1* y *CgFKS2*. La presencia de distintas mutaciones clínicamente significativas, principalmente en la región *Hot Spot 1* de los genes *FKS1* y *FKS2*, correlacionan con CMI's elevados de equinocandinas y el consecuente fracaso terapéutico (5).

Vale-Silva *et al.* realizaron pruebas de susceptibilidad en 1,380 aislamientos de *C. glabrata* colectados entre 2008 y 2013, reportando que el 3.1 %, 3.3 % y 3.6 % de los aislamientos fueron resistentes a anidulafungina, caspofungina y micafungina, respectivamente (28).

La emergencia de *Candida* MDR (sobre todo entre aislamientos de *C. glabrata*) que no responden a tratamientos con las tres clases de antifúngicos es alarmante (5). En nuestro país, la Secretaría de Salud menciona que la susceptibilidad de *C. glabrata* a azoles varía de sensible a intermedio y el 20% desarrollan resistencia durante la terapia o profilaxis con fluconazol (14).

Pfaller *et al.* demostraron la resistencia a equinocandinas de aislamientos resistentes a fluconazol de *C. glabrata* que incrementó de cero casos entre 2001 y 2004, a una frecuencia de 9.3 % entre 2006 y 2010, sosteniendo la hipótesis de que la resistencia de *C. glabrata* evoluciona rápidamente (45).

En cuanto a las nuevas especies del complejo *C. glabrata* descritas recientemente, algunos autores sugieren que éstas podrían ser menos susceptibles que *C. glabrata* a los azoles, especialmente *C. nivariensis*. Apoyando esta idea, Figueiredo-Carvalho *et al.* (41) reportan que los aislamientos de *C. nivariensis* son menos susceptibles que los aislamientos de *C. glabrata* a los azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol) que se utilizan comúnmente en el tratamiento de la candidosis. Por lo tanto, es necesario realizar controles periódicos de estas especies para determinar su perfil de susceptibilidad antifúngica (35,36).

Moreira *et al.*, evaluaron la susceptibilidad de tres cepas de *C. braccarensis* frente a anfotericina B, a la cual se mostraron susceptibles, y fluconazol, frente al cual fueron como susceptibles dosis dependiente (46).

2.10 Factores de virulencia en *Candida glabrata*

La virulencia sólo se expresa en ciertas condiciones. Esto es particularmente cierto para los agentes patógenos oportunistas, y en contraste con los patógenos especializados en los que la interacción con el hospedero es parte de su ciclo de vida. Por lo tanto, los microorganismos oportunistas sólo podrán expresar su potencial virulencia cuando se encuentran con un hospedero debilitado, cuando se encuentran en el hospedero equivocado o en el tejido equivocado (1). De hecho, en las especies que interactúan regularmente con el hospedero, tal como comensales, se espera que la selección actúe para atenuar la virulencia en condiciones estándar, debido a que la supervivencia del hospedero está vinculada a la supervivencia del comensal. En resumen, la virulencia en patógenos oportunistas debe considerarse como un accidente evolutivo, en lugar de como un objetivo evolutivo en sí mismo. Por otra parte, en los patógenos oportunistas, podemos considerar la virulencia como un fenotipo latente sobre todo que sólo se expresa en condiciones particulares (1).

Por diferentes mecanismos, llamados factores de virulencia, las levaduras pueden adherirse a células epiteliales y dispositivos médicos, seguido de la invasión de células epiteliales y tejido endotelial por medio de procesos enzimáticos, evadiendo la respuesta fagocítica de los neutrófilos. En el peor de los casos, una vez que ha alcanzado el torrente sanguíneo, puede diseminarse a cualquier órgano o sistema (14).

Los factores de virulencia juegan un papel crucial en los procesos de: colonización, adhesión, invasión, difusión y escape de las defensas del hospedero (41). La determinación de la especie de *Candida* es de importancia crítica, no sólo porque está relacionado con la susceptibilidad antifúngica, sino por la diferencia en los factores y potencia de virulencia entre las diferentes especies del género (14).

Escasos estudios a nivel mundial se han enfocado en evaluar los factores de virulencia de las especies del complejo *C. glabrata*, especialmente de las especies descritas recientemente. En cuanto a *C. glabrata sensu stricto*, se sabe que es una de las especies más robustas de *Candida* y puede sobrevivir en superficies inanimadas por cinco meses, mientras *C. albicans* no puede sobrevivir más de cuatro meses (27).

Tam *et al.* mencionan que *C. glabrata sensu stricto* no produce proteasas extracelulares, pero no queda desarmada, pues posee otras hidrolasas como las fosfolipasas. Éstas pueden facilitar el paso a través de la barrera fosfolipídica de las células epiteliales. *C. glabrata sensu stricto* además hidroliza enlaces tipo éster en los glicerofosfolípidos, una molécula común de las membranas celulares humanas. Éste patógeno sólo produce dos tipos de fosfolipasas, mientras *C. albicans* produce cuatro. Por otro lado, *C. glabrata* puede producir y liberar hemolisinas, esto es importante para la adquisición de hierro (27). Según Vale-Silva, esta levadura no produce hifas ni proteasas (28). Sin embargo, *C. glabrata* sí produce adhesinas, codificadas por los genes *Epa* (*Epithelial adhesins*) (27).

También se sabe que las Yapsinas, un tipo de aspartil proteasas presentes en *C. glabrata*, afectan directamente la interacción con las células de la defensa inmune innata, ya que son necesarias para la supervivencia de este organismo dentro de los macrófagos seguido de la fagocitosis. Además, *C. glabrata* es una levadura intrínsecamente tolerante al estrés oxidativo (28). Expresa genes de catalasa (CTA1) para resistencia al estrés de peróxido, permite resistir a la fagocitosis. Una vez fagocitados, los patógenos fúngicos controlan su metabolismo para digerir fuentes alternativas de carbono. Sin embargo, el ambiente interno de las células fagocíticas es generalmente pobre en fuentes de carbono. Dado que *C. glabrata* fermenta y asimila sólo glucosa y trehalosa, puede detoxificar

especies reactivas de oxígeno, causando la interrupción de la maduración normal de los fagosomas y, por lo tanto, la inhibición de la formación del fagolisosoma (27).

Como muchas otras especies de *Candida*, *C. glabrata* es capaz de formar biopelículas. Las biopelículas están compuestas por una matriz rica en polisacáridos que rodea al patógeno, previniendo la penetración de agentes antifúngicos y agresiones por parte del sistema inmune del hospedero, y se cree que contribuyen a las infecciones asociadas a catéteres venosos centrales, así como nutrición parenteral. La patogenia de este hongo puede ser atribuida a la formación de biopelículas y su relativamente alta resistencia a las terapias antifúngicas (28).

En cuanto a las especies recientemente descritas del complejo *C. glabrata*, hay poca información referente a sus factores de virulencia debido a su baja incidencia o falta de adecuada identificación.

Moreira *et al.*, describieron los factores de virulencia de tres cepas de *C. bracarensis*. Observaron que *C. bracarensis* fue capaz de producir biopelículas y hemolisinas, algunas cepas fueron capaces de presentar proteasas y, por otro lado, ninguna produjo fosfolipasas (46).

En cuanto a *C. nivariensis*, Figueiredo-Carvalho *et al.* encontraron un aislamiento clínico de *C. nivariensis* productor de biopelículas y proteasas. Sin embargo, no observaron producción de lipasas.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

La candidosis es la micosis oportunista de mayor incidencia a nivel mundial, siendo *C. glabrata* una de las especies NCA más frecuentemente asociadas a candidemias en América del Norte y Europa.

Recientemente se ha demostrado, mediante PCR y secuenciación de ADN, que *C. glabrata* es un complejo, el cual requiere la identificación precisa de sus especies.

A nivel mundial, hay poca información referente a la incidencia, distribución, perfiles de susceptibilidad antifúngica y factores de virulencia de las especies que conforman el complejo *C. glabrata*.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

A partir de una colección de 109 aislamientos clínicos previamente identificados por métodos tradicionales como *C. glabrata*, se realizó una reactivación metabólica y verificación de la pureza de cada cepa para posteriormente efectuar la confirmación molecular mediante PCR y secuenciación de la región ITS del ARN ribosomal. Se evaluaron los factores de virulencia de todas las cepas y se determinaron sus perfiles de susceptibilidad antifúngica.

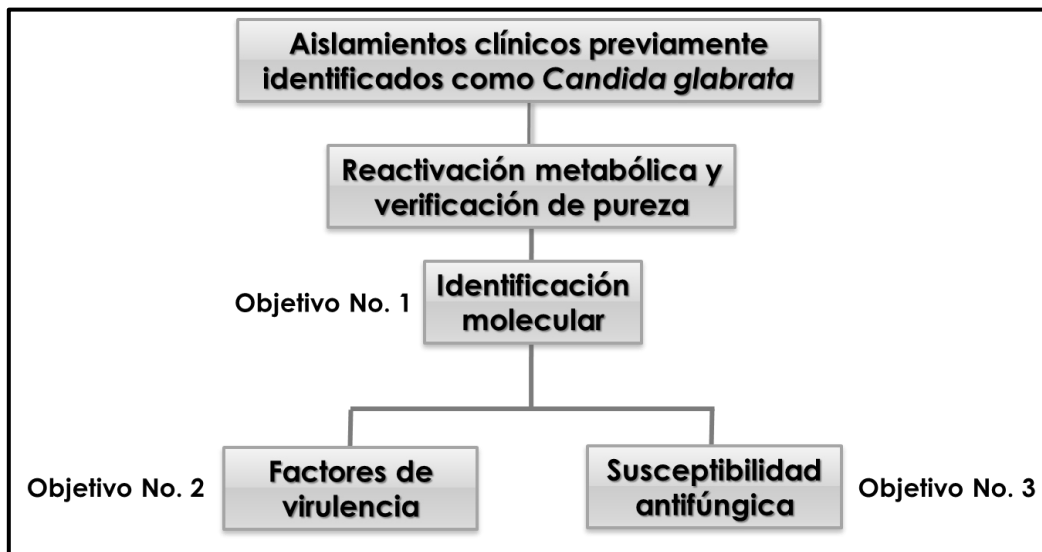


Figura 1. Estrategia general del trabajo.

4.2 Organismos

Se partió de una colección de 109 aislamientos clínicos previamente identificadas como *C. glabrata* por métodos microbiológicos convencionales. Estos aislamientos fueron recolectados en el periodo 2005-2015 en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas anexo al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UANL. Los orígenes clínicos de los aislamientos fueron diversos: 39 % procedentes de sangre, 27 % de exudado vaginal, 21 % de orina 7 % de líquido peritoneal y el resto de diversos orígenes. Los aislamientos provinieron de distintos centros médicos de México y fueron reidentificados mediante amplificación y posterior secuenciación de la región ITS empleando los cebadores ITS5 e ITS4 (47).

4.3 Identificación molecular

Los aislamientos previamente identificados por técnicas tradicionales como *C. glabrata* fueron reidentificados por PCR, secuenciación Sanger y posterior comparación con las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycology*).

4.3.1 Obtención del ADN

Para obtener el material genético de los organismos, éstos se sembraron en placas de SDA, las cuales se incubaron (Incubadora American Gold Series, modelo IS-81) a 37 °C por 24 h. A partir de este cultivo joven, se tomó la biomasa y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL. Enseguida, se le adicionaron 200 µL de solución de lisis enzimática, se

mezclaron en vortex y se incubaron por 2 h a 37 °C con agitación a 800 rpm (Eppendorf, Thermomixer C). Tras ésto, se agregaron 390 µL de TE 1x con SDS al 1 % + 4 µL de proteinasa K y se incubó por 1 h a 55 °C a 800 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se agregó al tubo 100 µL de NaCl 5M y se mezclaron en vortex. Posteriormente, se agregaron 80 µL de CTAB/NaCl, se mezclaron en vortex e incubaron a 65 °C por 10 min a 800 rpm. Adicionalmente, se agregaron 300 µL de SEVAG (24:1), 250 µL de fenol saturado y 100 µL de TE 1x, se mezclaron en vortex y se centrifugaron (Eppendorf, Centrífuga 5418) a 14,000 rpm por 8 min. Se separó la fase acuosa resultante y se colocó en un nuevo tubo de 1.5 mL. Se repitieron los dos últimos pasos y a la fase acuosa final se le agregaron 300 µL de alcohol isopropílico frío y 80 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2, esto se incubó a -20 °C por toda la noche. El tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó a la pastilla resultante 1 mL de etanol al 70 %, se mezcló en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol. El tubo destapado se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche para permitir la evaporación del etanol. Pasado ésto, se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de nucleasas, se incubó a 65 °C por 15 min y se llevó a cuantificar por espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se utilizaron los siguientes cebadores: ITS 5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para las amplificaciones de la región ITS del ADN ribosomal mediante PCR punto

final. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes: 95 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos consistentes de: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1.5 min y 72 °C por 1.5 min y al terminar los ciclos, un ciclo de 75 °C por 5 min. A continuación, se evidenció la generación del amplicón mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %. Se guardaron los tubos con los productos de PCR a -4 °C hasta su uso.

La purificación de los amplicones obtenidos se realizó mediante el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, los amplicones purificados se almacenaron a -20 °C hasta su secuenciación.

4.3.3 Secuenciación.

Las secuenciaciones se realizaron mediante el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador automatizado 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a través de los servicios del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) en San Luis Potosí, S.L.P., México. Las secuencias fueron analizadas en el programa BioEdit v7.2.5 y se depositaron las mismas en la plataforma GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4.4 Perfil enzimático

Se inocularon discos de papel filtro estéril sobre la placa del medio de cultivo correspondiente para cada prueba enzimática con 5 µL de un inóculo de concentración conocida (1.5×10^8 UFC/mL) para todos los medios, excepto para la prueba de hemolisina, donde se usaron 10 µL. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 2, 5, 7 y 10 días para los ensayos de hemolisinas, fosfolipasas, aspartil proteasas y esterases, respectivamente. La actividad enzimática fue expresada de acuerdo a su índice Pz (diámetro de la colonia/diámetro del halo más la colonia) según Price *et al.*(48). Los siguientes rangos fueron establecidos para la actividad enzimática de acuerdo con el índice Pz: muy fuerte, Pz < 0.69; fuerte, Pz = 0.70 - 0.79; media, Pz = 0.80 – 0.89; débil, Pz = 0.90– 0.99; y negativa, Pz = 1. La cepa *C. albicans* ATCC 90028 fue usada como control de calidad para todas las determinaciones de actividad enzimática y los ensayos se realizaron por duplicado. Los perfiles enzimáticos fueron comparados con el origen clínico de los aislamientos empleando la prueba Chi-cuadrada (X^2) en el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EUA).

4.4.1 Ensayo de fosfolipasas

La actividad fosfolipasa fue evaluada por el método de Price *et al.* (48), se usó como medio base SDA suplementado con glucosa al 3 %, NaCl 1M y CaCl₂ 5 mM. Esta solución se esterilizó en autoclave y posteriormente se le añadió 8 % de emulsión estéril de yema de huevo (Oxoid Limited, Cheshire, UK). La actividad fosfolipasa tras 5 días de incubación a 37 °C produce una zona densa de precipitación alrededor de la colonia que expresa estas enzimas.

4.4.2 Ensayo de proteasas

La actividad aspartil proteasa fue evaluada por el método de Borst y Fluit (10), para lo cual se utilizó el medio de albúmina sérica bovina (BSA) en placa, preparado con 1.17 % de carbón base de levadura, 0.01 % de extracto de levadura y 0.2 % de albúmina sérica bovina. La solución anterior se esterilizó por filtración y posteriormente se le añadió asépticamente una solución de 1.6 % de agar-agar previamente esterilizado por autoclave y atemperado. Se mezcló de manera uniforme y se vació en cajas de Petri. Se incubaron las placas previamente inoculadas a 37°C por 7 días. La presencia de un halo halo de precipitación alrededor de la colonia evidencia una actividad aspartil proteasa positiva.

4.4.3 Ensayo de hemolisinas

La actividad hemolítica fue evaluada por el método de Manns *et al.* (11), se determinó con ayuda del medio SDA suplementado con 3 % de glucosa, esterilizado por autoclave y atemperado para posteriormente adicionar de manera aséptica 7 % de sangre. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C por 2 días. La observación de un halo de hemólisis alrededor de la colonia inoculada en la placa es indicativo de la actividad hemolítica. Este halo puede presentarse como hemólisis alfa (hemólisis completa, medio translúcido) o hemólisis beta (hemólisis parcial, color amarillo-verdoso). En caso de no presentarse alguno de estos dos fenómenos se le denomina hemólisis gamma (sin actividad hemolítica).

4.4.4 Ensayo de esterases

La actividad esterasa fue evaluada por el método de Rudek (12), se determinó utilizando el medio de prueba de opacidad Tween 80, preparado con 10 g de Bacto Peptona, 5 g de NaCl, 0.1 g de CaCl₂ y 15 g de agar en 1 L de agua destilada (pH final ajustado a 6.8), la solución resultante se esterilizó en autoclave y finalmente se le adicionaron 5 mL de Tween 80 al medio atemperado. Se inocularon las placas y se incubaron por 10 días a 37 °C. Las enzimas lipolíticas hidrolizan el medio de prueba, liberando ácidos grasos, los cuales se unen después al calcio, formando un halo de precipitación alrededor de las colonias positivas para estas enzimas.

4.4.5 Ensayo de DNasas

La actividad de DNasa se estudió con ayuda del medio comercial Agar para prueba de DNasa (Difco, Detroit, MI, EUA). La presencia de un halo incoloro alrededor del sitio de inoculación tras 7 días de incubación a 37 °C es indicativa de actividad DNasa. La cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se utilizó como control positivo.

4.4.6 Ensayo de actividad coagulasa

La actividad coagulasa se determinó en tubo de ensayo con plasma humano. Se inoculó con una asada de un cultivo joven de la cepa a evaluar y se incubaron los tubos a 37 °C por 24 h. La formación de un coágulo al fondo del tubo evidencia la actividad coagulasa.

4.4.7 Ensayo de actividad catalasa

La actividad catalasa se determinó en portaobjetos de vidrio con una gota de peróxido de hidrógeno comercial, al cual se le adicionó una asada de un cultivo joven de la cepa a evaluar. La liberación de oxígeno se observó a los pocos segundos, correspondiendo a una reacción positiva de actividad catalasa.

4.5 Susceptibilidad antifúngica

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* se efectuaron utilizando el método de microdilución en placa, de acuerdo con los lineamientos estipulados en el documento M27-A3 del CLSI de EUA. A partir de un cultivo joven, se hizo una suspensión de levaduras en solución salina a 0.85 %T. A partir de esta suspensión, se hará la dilución 1:50 y posteriormente 1:20, según lo estipulado en el documento, para obtener una concentración entre 1×10^3 y 5×10^3 . Con esta solución, fueron inoculadas placas de poliestireno de 96 pozos de fondo redondo (Corning® Assay Plate, 96 Well Clear Round Bottom, New York, EUA) previamente cargadas con 100 µL de los antifúngicos a evaluar. Los antifúngicos utilizados se obtuvieron de sus respectivas compañías farmacéuticas, los cuales fueron: caspofungina (Cancidas®; Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA), micafungina (Mycamine®; Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japón) y anidulafungina (Equaltha®; Ben Venue Laboratories Inc., Ohio, EUA). Las diez concentraciones de las drogas usadas fueron en el rango entre 0.0313 y 32 µg/mL. Se incubaron a 37°C y se realizó la lectura para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) AL 50 % de inhibición a las 24 h, usando como cepas controles *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación molecular

A partir de una colección de 109 aislamientos previamente identificados por métodos convencionales como *C. glabrata*, se realizaron ensayos de PCR punto final para amplificar la región ITS y posteriormente secuenciación. Se identificaron 108 cepas como *C. glabrata sensu stricto* y una cepa (Exv 73) como *C. bracarensis* (Figura 1) con alto porcentaje de homología (99 %). No se detectaron cepas de *C. nivariensis*.

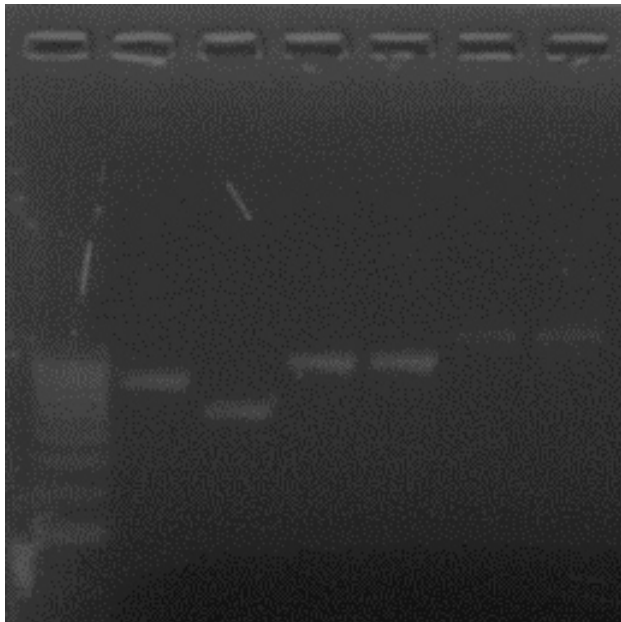


Figura 2. Imagen representativa de un gel de agarosa al 2 %. Carril 1: marcador de peso molecular (100 a 1000 pb). Carril 2: *C. bracarensis* CBS 9983. Carril 3: *C. nivariensis* CBS 10154. Carril 4: Exv 73. Carriles 5 al 7: aislamientos clínicos de *C. glabrata*.

Todas las secuencias de las cepas identificadas fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los siguientes números de acceso: MF187218 - MF187325 para las cepas de *C. glabrata sensu stricto* y MF187326 para la cepa de *C. bracarensis*.

5.2 Perfil enzimático

Se evaluó el perfil enzimático de las cepas de *C. glabrata sensu stricto* para siete actividades enzimáticas (Tabla 3). Se encontró que la mayoría de las cepas presentaron actividad aspartil proteasa clasificada como “Muy fuerte” ($P_z \leq 0.69$). El 79 % de las cepas mostraron actividad fosfolipasa, la mayoría de estas clasificadas como “Muy fuerte” ($P_z \leq 0.69$). Para la actividad esterasa, sólo el 12 % de las cepas mostraron resultados positivos. La actividad hemolítica no fue encontrada en ninguna cepa de *C. glabrata sensu stricto*. El 100 % de las cepas mostró actividad catalasa. Sin embargo, ninguna presentó actividad DNasa ni coagulasa. Se evaluó también el perfil enzimático de la cepa identificada como *C. bracarensis* empleando las mismas pruebas (Tabla 4). *C. bracarensis* mostró actividad “Muy fuerte” en las pruebas de aspartil proteasa y fosfolipasa ($P_z \leq 0.69$). No se detectó actividad esterasa, hemolisina, DNasa ni coagulasa en la cepa de *C. bracarensis*. Dicha cepa sí mostró actividad catalasa.

Tabla 3. Resultados del perfil enzimático de las cepas de *C. glabrata sensu stricto*.

<i>n</i>	Categorización	Clasificadas según índice Pz				DNasa <i>n</i>	Coagulasa <i>n</i>	Catalasa <i>n</i>
		Aspartil proteasa <i>n</i>	Fosfolipasa <i>n</i>	Esterasa <i>n</i>	Hemolisina <i>n</i>			
108	Muy fuerte	105	58	13	0			
	Fuerte	2	15	0	0			
	Moderada	1	10	0	0			
	Débil	0	2	0	0			
	Negativa	0	23	95	108	108	108	
	Positiva							108

Tabla 4. Resultados del perfil enzimático de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* CBS

Cepa	Pruebas enzimáticas						
	Aspartil proteasa	Fosfolipasa	Esterasa	Hemolisina	DNasa	Coagulasa	Catalasa
<i>C. bracarensis</i> Exv 73	Muy fuerte	Muy fuerte	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>C. bracarensis</i> CBS 9983	Muy fuerte	Muy fuerte	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>C. nivariensis</i> CBS 10154	Muy fuerte	Muy fuerte	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

5.3 Susceptibilidad antifúngica

Se evaluó el perfil de susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *C. glabrata sensu stricto* (Tabla 5) según la metodología de microdilución en placa establecida en el documento M27-A3 del CLSI frente a caspofungina, micafungina y anidulafungina. Únicamente tres cepas fueron resistentes a las equinocandinas, cada una a un antifúngico distinto. Los porcentajes de resistencia fueron menores al 1 % para todos los antifúngicos. No se detectaron cepas MDR.

Tabla 5. Susceptibilidad antifúngica de las cepas de *C. glabrata sensu stricto*.

<i>n</i>	Antifúngico	CMI ^a (µg/mL)			% R ^b
		Rango	50 %	90 %	
108	Anidulafungina	0.0156-1	0.0625	0.0625	0.92
	Caspofungina	0.03125-0.5	0.313	0.0625	0.92
	Micafungina	0.03125-0.25	0.313	0.0625	0.92

^aCMI, Concentración Mínima Inhibitoria^bR, Resistencia (anidulafungina y caspofungina CMI ≥0.5 µg/mL) (micafungina CMI ≥0.25 µg/mL)

También se evaluó la susceptibilidad antifúngica de *C. braccarensis* frente a las tres equinocandinas (Tabla 6). *C. braccarensis* fue susceptible a caspofungina, micafungina y anidulafungina usando los puntos de corte para *C. glabrata* del CLSI en su documento M27-S4 (caspofungina y anidulafungina CMI ≥0.5 µg/mL; micafungina CMI ≥0.25 µg/mL).

Tabla 6. Susceptibilidad antifúngica de *C. braccarensis*.

Aislamiento	Anidulafungina*	CMI ^a (µg/mL)	
		Caspofungina*	Micafungina
<i>C. braccarensis</i> Exv73	0.0156	0.03125	0.03125
<i>C. braccarensis</i> CBS 10154	0.0625	0.125	0.125

^aCMI, Concentración Mínima Inhibitoria.*Puntos de corte para *C. glabrata*.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

Dos especies crípticas pertenecientes al complejo *C. glabrata* han sido descritas recientemente, en los años de 2005 y 2006 (32,33) y a partir de entonces diversos estudios se han enfocado en conocer su epidemiología. A pesar de esto, poco es el conocimiento actual sobre epidemiología, patrones de susceptibilidad antifúngica y factores de virulencia de estos organismos (39,46,49). Estas especies crípticas en todos los reportes representan un bajo porcentaje de los aislamientos del complejo *C. glabrata* (42). En nuestra investigación encontramos un bajo porcentaje de la especie *C. bracarensis*, con únicamente el 0.92 % de todos los aislamientos identificados (1/109). Con respecto a otros estudios de grandes colecciones de cepas del complejo *C. glabrata*, nuestro porcentaje es similar, siendo estos menores al 3 % (38,43,49,50).

Diversos estudios alrededor del mundo han identificado una baja cantidad de cepas de *C. bracarensis*. Hou *et al.* (50) identificaron 0.1 % de *C. bracarensis*, mientras Li (38) obtuvo 0.34 %, ambos de colecciones de cepas chinas. Por otro lado, porcentajes ligeramente más altos fueron encontrados por Cuenca-Estrella *et al.* (49) y Bishop *et al.* (43) con 2.09 % en una colección española y 1.27 % en EUA, respectivamente. Morales-López *et al.* (52), a partir de cepas colectadas durante 30 años, identificaron 2.45 % de *C. bracarensis* en Argentina. Lockhart *et al.* (40), por su parte encontraron 0.13 % de cepas de *C. bracarensis* en una gran colección que incluyó 28 países, sugiriendo que estas especies crípticas son raramente aisladas. Por otro lado, algunos autores han sugerido que *C. bracarensis* es menos frecuente que los aislamientos de *C. nivariensis* (42,51). Sin

embargo, en nuestro estudio no se detectaron cepas de *C. nivariensis*, por lo cual, nuestra investigación sugiere lo contrario.

A pesar del incremento de las infecciones por especies NCA en el mundo y teniendo a *C. glabrata* dentro de los primeros lugares en candidosis (6,53,54), para el complejo *C. glabrata*, existen escasos estudios, con pocas cepas incluidas, que evalúen los posibles factores de virulencia que pudieran exhibir estas especies. Por mencionar algunos, Tay *et al.* (55) obtuvieron 80 % de cepas productoras de aspartil proteasa y 0 % de actividad fosfolipasa, en un estudio de sólo 5 cepas de *C. glabrata* evaluadas. D'Eca *et al.* (56) observaron un 60 % de actividad proteasa y 70 % de actividad fosfolipasa en 10 aislamientos clínicos de *C. glabrata*. Por otro lado, Pinto *et al.* (57) obtuvieron 0 % (0/19) de actividad fosfolipasa y 79 % de actividad proteasa en una colección de 19 aislamientos. Sachin *et al.* (58) mostraron porcentajes de 29 %, 43 % y 21 % para fosfolipasa, proteasa y actividad hemolítica, respectivamente en 14 aislamientos. Como puede observarse, los porcentajes mostrados en la literatura son muy variables y esto es probablemente debido a la baja cantidad de cepas de *C. glabrata* por estudio. En nuestro estudio, con 108 cepas de *C. glabrata* evaluadas, obtuvimos 100 %, 79 % y 0 % de cepas positivas para las actividades proteasa, fosfolipasa y hemolítica, respectivamente. También se evaluó la actividad esterasa (12 %), DNAsa (0 %), coagulasa (0 %) y catalasa (100 %), las cuales son poco reportadas en estudios de factores de virulencia para el género *Candida* (59). Además, se encontró correlación estadística entre la producción de fosfolipasa clasificada como “Muy fuerte” y las cepas provenientes de exudado vaginal ($P<0.05$). Por otro lado, y dado que existen pocos estudios sobre los factores de virulencia de las nuevas especies crípticas (46), se evaluó la misma actividad enzimática en el aislamiento clínico de *C. bracarensis*,

obteniendo un perfil similar al de *C. glabrata sensu stricto*, a excepción de la producción de esterasa, actividad para la cual, *C. bracarensis* mostró un resultado negativo. Estos resultados difieren a los reportados por Moreira *et al.* (46), quienes no reportan cepas positivas de *C. bracarensis* para actividad fosfolipasa; sin embargo, ellos sí reportan actividad hemolítica (3/3) contrario a nuestro estudio. Esta diferencia pudo ser debida a un sometimiento previo al medio con sangre que estos autores realizaron.

En los últimos años, se ha reportado el aumento en cuanto a la resistencia antifúngica del complejo *C. glabrata* frente a las equinocandinas (7), del 3 % al 18 % en instituciones de cuidado de pacientes de alto riesgo en EUA. Estudios reportan en la literatura distintos porcentajes de resistencia antifúngica para *C. glabrata*. Pfaller *et al.* (60) presenta porcentajes de 0.85 % para anidulafungina y micafungina, mientras que para caspofungina el 1.7 % fue resistente. Posteriormente, Pham *et al.* (61) reportaron porcentajes de resistencia frente a las equinocandinas de entre 3.1 % y 3.6 %. Nuestros resultados para *C. glabrata sensu stricto* revelan porcentajes menores al 1 % de resistencia frente a caspofungina, micafungina y anidulafungina. Por otro lado, no se encontró resistencia de *C. bracarensis* a las equinocandinas. Existen escasos estudios de susceptibilidad antifúngica de *C. bracarensis* frente a equinocandinas (40,43,49,50,52). Ninguno de los estudios realizados hasta el momento ha mostrado resistencia de *C. bracarensis* frente a esta clase de antifúngicos; sin embargo, son necesarios más estudios, con mayor cantidad de cepas, para determinar si *C. bracarensis* presenta un perfil de susceptibilidad antifúngica distinto al de *C. glabrata sensu stricto*.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

C. glabrata sensu stricto es un importante patógeno emergente, del cual se han reportado incrementos considerables en su resistencia frente a los antifúngicos, al igual que cepas resistentes de sus especies crípticas. En el presente trabajo se identificó una cepa de *C. bracarensis*, especie que no había sido reportada previamente en México. Se encontró que la mayoría de las cepas de *C. glabrata sensu stricto* presentaron una producción de aspartil proteasa y fosfolipasa clasificada como “Muy fuerte”. Observamos que el patrón de actividad enzimática de *C. bracarensis* es similar al de *C. glabrata sensu stricto*. Esta investigación contribuye al conocimiento de los factores de virulencia del complejo *C. glabrata*. Existen escasos estudios de susceptibilidad antifúngica del complejo *C. glabrata* frente a las equinocandinas. En nuestro estudio, las cepas de *C. glabrata sensu stricto* presentaron bajos porcentajes de resistencia frente a las equinocandinas y no se encontró resistencia de *C. bracarensis* frente a estos antifúngicos. Es necesario desarrollar investigaciones posteriores con mayor número de cepas de *C. bracarensis*, para poder establecer tendencias en sus patrones enzimáticos y de susceptibilidad antifúngica.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Tras el descubrimiento de las nuevas especies del complejo *C. glabrata*, diversos estudios se han enfocado en conocer las diferencias en sus factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica con *C. glabrata*. Sin embargo, los esfuerzos por encontrar estas especies han arrojado bajos números de cepas, tornando complicada esta comparación. Por este motivo son necesarios esfuerzos en distintas regiones del mundo para aumentar el número de cepas de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* identificadas y evaluadas frente a los antifúngicos actuales y obtener sus perfiles enzimáticos.

Este estudio contribuye al conocimiento de los patrones enzimáticos (de gran importancia para conocer los mecanismos de virulencia de esta especie) y de susceptibilidad frente a las equinocandinas, las cuales han sido incluidas en pocos estudios que evalúan la susceptibilidad antifúngica de la especie *C. bracarensis*. En este sentido, la presente investigación da pie a otros estudios que busquen estas nuevas especies en grandes colecciones de aislamientos de *C. glabrata* y, recuperando un mayor número de cepas de *C. bracarensis* y *C. nivariensis*, se genere más información que nos permita establecer tendencias en cuanto a sus factores de virulencia y patrones de susceptibilidad antifúngica con el objetivo de conocer más sobre estos patógenos y cómo tratar a pacientes con infecciones debidas a estos nuevos agentes etiológicos.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

1. Gabaldón T, Carreté L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2016 Mar;16(2).
2. Alcoba-Flórez J, Arévalo M del P, González-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, *et al.* PCR Protocol for Specific Identification of *Candida nivariensis*, a Recently Described Pathogenic Yeast. *J Clin Microbiol.* 2005 Dec 1;43(12):6194–6.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36(1):1–53.
4. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-Acquired Candidemia: The Attributable Mortality and Excess Length of Stay. *Arch Intern Med.* 1988 Dec 1;148(12):2642–5.
5. Kołaczowska A, Kołaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jan 21;dkv445.
6. Lockhart SR. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clin Microbiol Newsl.* 2014 Sep 1;36(17):131–6.
7. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidosis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Med Mycol.* 2016 Jan 1;54(1):1–22.
8. Chang A, Neofytos D, Horn D. Candidemia in the 21st century. *Future Microbiol.* 2008 Aug;3(4):463–72.

9. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Rev Iberoam Micol.* 2016 Jul;33(3):133–9.
10. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, *et al.* Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Jan;43(1):78–81.
11. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* 2013 Nov;60(11):B4698.
12. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Secular Trends in Candidemia- Related Hospitalization in the United States, 2000–2005. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(10):978–80.
13. Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J. The Direct Cost and Incidence of Systemic Fungal Infections. *Value Health.* 2002 Jan 1;5(1):26–34.
14. Diagnóstico y Tratamiento de Candidosis Invasiva en el Adulto. México: Secretaría de Salud. 2012.
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, *et al.* International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep 1;39(9):3254–9.

16. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, *et al.* Incidence of Bloodstream Infections Due to Candida Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. J Clin Microbiol. 2004 Apr 1;42(4):1519–27.
17. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, *et al.* Do In Vitro Susceptibility Data Predict the Microbiologic Response to Amphotericin B? Results of a Prospective Study of Patients with Candida Fungemia. J Infect Dis. 1998 Feb 1;177(2):425–30.
18. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. Int J Infect Dis. 2010 Nov;14(11):e954–66.
19. Valerio M, Vena A, Bouza E, Reiter N, Viale P, Hochreiter M, *et al.* How much European prescribing physicians know about invasive fungal infections management? BMC Infect Dis. 2015;15:80.
20. Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream Infections Due to Candida Species in the Intensive Care Unit: Identifying Especially High-Risk Patients to Determine Prevention Strategies. Clin Infect Dis. 2005 Sep 15;41(Supplement_6):S389–93.
21. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, *et al.* Time to Initiation of Fluconazole Therapy Impacts Mortality in Patients with Candidemia: A Multi-Institutional Study. Clin Infect Dis. 2006 Jul 1;43(1):25–31.

22. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep 1;49(9):3640–5.
23. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* 2013;5(7):63.
24. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular Trend of Hospital-Acquired Candidemia among Intensive Care Unit Patients in the United states during 1989–1999. *Clin Infect Dis.* 2002 Sep 1;35(5):627–30.
25. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, *et al.* Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clin Infect Dis.* 2003 Nov 1;37(9):1172–7.
26. Abbes S, Amouri I, Sellami H, Sellami A, Makni F, Ayadi A. A review of molecular techniques to type *Candida glabrata* isolates. *Mycoses.* 2010 Nov 1;53(6):463–7.
27. Tam P, Gee K, Piechocinski M, Macreadie I. *Candida glabrata*, Friend and Foe. *J Fungi.* 2015 Sep 16;1(2):277–92.
28. Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2017 Jun 19];15(4). Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article/15/4/fov025/644889/Tipping-the-balance-both-ways-drug-resistance-and>

29. Malani AN, Psarros G, Malani PN, Kauffman CA. Is age a risk factor for *Candida glabrata* colonisation? *Mycoses*. 2011 Nov 1;54(6):531–7.
30. Milazzo L, Peri AM, Mazzali C, Grande R, Cazzani C, Ricaboni D, *et al.* Candidaemia Observed at a University Hospital in Milan (Northern Italy) and Review of Published Studies from 2010 to 2014. *Mycopathologia*. 2014 Oct 1;178(3–4):227–41.
31. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep 1;46(9):2902–5.
32. Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(1):313–7.
33. Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Arévalo M del P. Phenotypic and Molecular Characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a Possible New Opportunistic Fungus. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug 1;43(8):4107–11.
34. Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Golas M, Piskorska K, Gozdowski D, Netsvyetayeva I. *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2014 Dec 1;57(12):747–53.

35. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. *J Clin Microbiol*. 2008 Mar 1;46(3):933–8.
36. Fujita S, Senda Y, Okusi T, Ota Y, Takada H, Yamada K, *et al*. Catheter-Related Fungemia Due to Fluconazole-Resistant *Candida nivariensis*. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct 1;45(10):3459–61.
37. Sharma C, Wankhede S, Muralidhar S, Prakash A, Singh PK, Kathuria S, *et al*. *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidosis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 May 1;76(1):46–50.
38. Li J, Shan Y, Fan S, Liu X. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in Vulvovaginal Candidosis. *Mycopathologia*. 2014 Oct 1;178(3–4):279–83.
39. Tay ST, Lotfalikhani A, Sabet NS, Ponnampalavanar S, Sulaiman S, Na SL, *et al*. Occurrence and Characterization of *Candida nivariensis* from a Culture Collection of *Candida glabrata* Clinical Isolates in Malaysia. *Mycopathologia*. 2014 Oct 1;178(3–4):307–14.
40. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, *et al*. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr 1;47(4):1216–7.

41. Figueiredo-Carvalho MHG, Ramos L de S, Barbedo LS, Chaves AL da S, Muramoto IA, Santos ALSD, *et al.* First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016 Jan;111(1):51–8.
42. Morales-López SE, Taverna CG, Bosco-Borgeat ME, Maldonado I, Vivot W, Szusz W, *et al.* *Candida glabrata* species complex prevalence and antifungal susceptibility testing in a culture collection: First description of *Candida nivariensis* in Argentina. *Mycopathologia.* 2016 Dec 1;181(11–12):871–8.
43. Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG. *Candida bracarensis* Detected among Isolates of *Candida glabrata* by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization: Susceptibility Data and Documentation of Presumed Infection. *J Clin Microbiol.* 2008 Feb 1;46(2):443–6.
44. Valdés G, Susana B. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cuba Farm.* 2005 Aug;39(2):1–1.
45. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr 1;50(4):1199–203.
46. Moreira A, Silva S, Botelho C, Sampaio P, Pais C, Henriques M. *Candida bracarensis*: Evaluation of Virulence Factors and its Tolerance to Amphotericin B and Fluconazole. *Mycopathologia.* 2015 Dec 1;180(5–6):305–15.

47. White T, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. (PDF Download Available) [Internet]. ResearchGate. [cited 2017 Jun 8]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/223058289_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_Rna_Genes_for_Phylogenetics

48. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Jan 1;20(1):7–14.

49. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, *et al*. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. *Med Mycol*. 2011 Jul 1;49(5):525–9.

50. Hou X, Xiao M, Chen SC-A, Wang H, Yu S-Y, Fan X, *et al*. Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Multi-Center Chinese Collection of Yeasts. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Jan 19 [cited 2017 Apr 25];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5243801/>

51. Angoulvant A, Guitard J, Hennequin C. Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2017 May 30];16(2). Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article/16/2/fov114/2570114/Old-and-new-pathogenic-Nakaseomyces-species>

52. Morales-López S, Dudiuk C, Vivot W, Szusz W, Córdoba SB, Garcia-Effron G. Phenotypic and molecular evaluation of echinocandin susceptibility of *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* strains isolated during 30 years in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May 1;AAC.00170-17.
53. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis* [Internet]. 2014 [cited 2017 Apr 26];2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4227454/>
54. Hrabovský V, Takáčová V, Schréterová E, Pastvová L, Hrabovská Z, Čurová K, *et al*. Distribution and antifungal susceptibility of yeasts isolates from intensive care unit patients. *Folia Microbiol (Praha)*. 2017 Mar 30;1–6.
55. Tay ST, Abidin IAZ, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol*. 2011 Jul 1;49(5):556–60.
56. D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo P de MS, Monteiro C de A. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Jun;44(3):334–8.
57. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med*. 2008 Nov 1;37(10):587–92.

58. Sachin CD, Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *Int J Med Biomed Res.* 2012 Jan 1;1(2):153–7.
59. Tellapragada C, Eshwara VK, Johar R, Shaw T, Malik N, Bhat PV, *et al.* Antifungal Susceptibility Patterns, In Vitro Production of Virulence Factors, and Evaluation of Diagnostic Modalities for the Speciation of Pathogenic *Candida* from Blood Stream Infections and Vulvovaginal Candidosis. *J Pathog.* 2014 Jul 7;2014:e142864.
60. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, *et al.* In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan 1;46(1):150–6.
61. Pham CD, Iqbal N, Bolden CB, Kuykendall RJ, Harrison LH, Farley MM, *et al.* Role of FKS Mutations in *Candida glabrata*: MIC Values, Echinocandin Resistance, and Multidrug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug 1;58(8):4690–6.

APÉNDICES

Apéndice A: Preparación de reactivos

Agar dextrosa de Sabouraud

Mezclar 40 g de glucosa, 5 g de peptona de caseína, 5 g de bactopectona y 15 g de agar bacteriológico en 1 L de agua destilada. Disolver en plancha con calor y agitación para posteriormente esterilizar por autoclave.

Acetato de sodio 3M pH 5

Disolver 12.3 g de acetato de sodio en 25 mL de agua destilada. Ajustar a pH 5.0 con ácido acético glacial y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

BaCl₂ 1 %

Disolver 1 g de BaCl₂ en 100 mL de agua destilada.

Buffer de carga

Mezclar 500 µL de agua ultrapura con 500 µL de glicerol y una pizca de azul de bromofenol.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (solución stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultra pura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4 °C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

CTAB/NaCl (CTAB 10 %/NaCl 0.7 M)

Disolver 4.1 g de NaCl en 80 mL de agua destilada, agregar lentamente 10 g de CTAB y calentar a 65 °C mientras se mezclan. Ajustar a un volumen de 100 mL.

EDTA 500 mM pH 8.0 (ácido etilen-diamino-tetracético).

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA.2H₂O en 40 mL de agua ultra pura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

Etanol 70%

Mezclar 70 mL de etanol al 100% más 30 mL de agua destilada estéril.

Fenol saturado

1. Destilación: Se funde el fenol a 68 °C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180 °C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización.
2. Saturación: Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el ADN puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.
3. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1 % (función antioxidante).
4. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).

5. Agitar durante 48 h a temperatura de refrigeración, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación.
6. Repetir la misma operación, pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0.
7. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo mercaptoetanol a una concentración 0.2 %.
8. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco obscuro a -20 °C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4 °C.

Gel de agarosa 1.2%

Disolver 0.48 g de agarosa en 40 mL de solución TAE 1X en un matraz, calentar en microondas por 40 s, agregar 40µL de Bromuro de etidio, vaciar en la cámara, colocar el peine y dejar solidificar.

Gel agarosa 2%

Disolver 0.8 g de agarosa en 40 mL de solución TAE 1X en un matraz, calentar en microondas por 50s, agregar 40µL de Bromuro de etidio, vaciar en la cámara, colocar el peine y dejar solidificar.

H₂SO₄ 1 %

Diluir 1 mL de H₂SO₄ concentrado en 100 mL de agua destilada.

Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 Mm a pH 7.5 con SDS al 10%

(Dodecil sulfato de sodio). Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

SDS 1% (Dodecil-sulfato de sodio)

Mezclar 5 mL de una solución de SDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

Solución SEVAGE (24:1)

Disolver 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico.

Solución salina 0.85 %

Disolver 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave.

Solución TAE 50X (stock)

Disolver 24.2 g de Tris-Base, 5.7 mL de ácido acético glacial y 1.86 g de EDTA·2H₂O. Aforar a un volumen de 100 mL con agua ultrapura.

Solución TAE 1X

Tomar 20 mL de la solución TAE 50X y aforar a un volumen de 1 L con agua ultrapura

Solución de lisis enzimática

Disolver 1000 µL de Tris-HCl 20 mM a pH 8, 200 µL de EDTA 2 mM y 600 µL de Triton x-100 1.2% en 50 mL de agua ultrapura.

TE (Tris-EDTA) 1X pH 8

Mezclar 500 μ L de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 Y 50 μ L de EDTA 500 mM en agua destilada y ajustar el pH a 8.0. Aforar a 25 mL de en agua destilada. Y esterilizar en autoclave.

TE 1X con SDS 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

Tris-HCl 500 mM, pH 8 (Solución stock)

Disolver 30.3 g de TRIS base en 300 mL de agua ultra pura, ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland

Añadir 0.1 mL de BaCl_2 al 1 % a 9.9 mL de H_2SO_4 al 1 %.

Apéndice B: Divulgación de resultados



Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

por su presentación de Trabajo Libre

Cartel A30

Título EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO CANDIDA GLABRATA

Autores ESPINOSA-PÉREZ JOSÉ FERNANDO*; TREVIÑO-RANGEL ROGELIO DE J.; ELIZONDO-ZERTUCHE MARIANA; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ GLORIA M. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. MONTERREY, MÉXICO.

Durante el **XLII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica** del 24 al 27 de Mayo de 2017 en el Centro de Convenciones William O. Jenkins, Puebla, Puebla.

Noris M. Pavía Ruz.

Dra. Noris Marlene Pavía Ruz
Presidente AMIMC A.C.

Dra. Patricia Cornejo Juárez
Secretario Académico